

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
: Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
6. Mai 2005 (06.05.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2005/039633 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 39/008**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2004/002383

(22) Internationales Anmeldedatum:  
22. Oktober 2004 (22.10.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
03090368.6 24. Oktober 2003 (24.10.2003) EP

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): MOLOGEN AG [DE/DE]; Fabeckstrasse 30, 14195 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): WITTIG, Burghardt [DE/DE]; Salzachstrasse 33, 14129 Berlin (DE). FUERTES-LÓPEZ, Laura [ES/ES]; C/Alonso Cano 72, 3º dcha, E-28003 Madrid (ES). TIMÓN-JIMÉNEZ, Marcos [ES/ES]; C/ Santa Clara 34, 2K, E-28200 San Lorenzo de El Escorial (ES).

(74) Anwalt: BQECKH, Tobias; Hertin Anwaltssozietät, Kurfürstendamm 54/55, 10707 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht  
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: AGENT FOR TREATING LEISHMANIA INFECTIONS

(54) Bezeichnung: MITTEL ZUR BEHANDLUNG VON INFektIONEN MIT LEISHMANIEN

(57) **Abstract:** The invention relates to using a combination of DNA-expression constructs for producing a drug for immunisation against leishmania infections and a corresponding vaccine. The DNA-expression construct is also disclosed. According to said invention the immunogene P36 LACK is used in combination with a leishmania infantum thiol-specific antioxidant protein gene (TSA), leishmania infantum kinetoplastid membrane protein 11 (KMP-11) and with a leishmania infantum GP63 antigen for producing an immune response. Plasmides, preferably minimalist immunologically defined gene-expression constructs (MIDGE) can be used in the form of the DNA-expression construct. The inventive DNA-expression construct makes it possible to produce a vaccine for treating leishmania infectious diseases and is used in the form of a component of said vaccine.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft die Verwendung einer Kombination von DNA-Expressionskonstrukten zur Herstellung eines Arzneimittels zur Immunisierung gegen Leishmanien-Infektionen, sowie eine entsprechende Vakzine. Die DNA-Expressionskonstrukte selbst sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung. Erfahrungsgemäß ist insbesondere vorgesehen, dass das immunogene p36 LACK in Kombination mit dem Leishmania infantum *thiol-specific antioxidant protein* Gen (TSA), dem Leishmania infantum *kinetoplastid membrane protein 11* Gen (Kmp-11) und dem Leishmania infantum gp63 Antigen zur Erzeugung einer Immunantwort verwendet wird. Als DNA-Expressionskonstrukte können Plasmide eingesetzt werden, bevorzugt werden erfahrungsgemäß minimalistische, immunologisch definierte Genexpressionskonstrukte (MIDGE) verwendet. Die erfahrungsgemäßen DNA-Expressionskonstrukte dienen zur Herstellung eines Impfstoffes zur Behandlung von Leishmanien-Infektionskrankheiten und sind Bestandteil einer entsprechenden Vakzine.

**WO 2005/039633 A1**

- 1 -

MITTEL ZUR BEHANDLUNG VON INFektIONEN MIT LEISHMANIEN

Die Erfindung betrifft die Verwendung einer Kombination von DNA-Expressionskonstrukten zur Herstellung eines Arzneimittels zur Immunisierung gegen Leishmaniose-Infektionen, sowie eine entsprechende Vakzine. Die DNA-Expressionskonstrukte selbst sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Leishmanien sind trypanosomatide Flagellaten aus der Ordnung Kinetoplastida, die durch weibliche blutsaugende Sandmücken der Gattung Phlebotomus und Lutzomyia auf verschiedene Säugetierspezies und auf den Menschen übertragen werden. Leishmaniosen sind Erkrankungen mit verschiedenen klinischen Krankheitsbildern, die ein bedeutendes Gesundheitsproblem darstellen. Die WHO schätzt, dass weltweit ca. 12 Millionen Menschen von der Krankheit betroffen sind. Ca. 2 bis 9% aller HIV-Patienten erkranken an viceraler Leishmaniose, damit ist dies die dritt häufigste parasitäre Krankheit, an der HIV-positive Personen erkranken. Während bei den mukokutanen und kutanen Leishmaniosen erhebliche Gewebedestruktionen auftreten, endet eine unbehandelte viszerale Leishmaniose (Kala-Azar) meist tödlich.

Für die Behandlung der Erkrankung stehen nur wenige klinisch erprobte Medikamente zur Verfügung. So werden seit etwa 60 Jahren zur Therapie der viszeralen Leishmaniose Chemotherapeutika – meist Verbindungen des Schwermetalls Antimon – eingesetzt. Die zum Teil massive Toxizität der meisten dieser Präparate begrenzt jedoch deren Einsatz. Zudem haben die Leishmanien in vielen Gebieten Resistenzen gegen Antimonpräparate entwickelt (J Postgrad Med. 2003 Jan-Mar; 49(1):61-8).

Eine verträgliche und protektive Routineimpfung gibt es bislang nicht.

Da Personen, die die Infektion überstanden haben, eine starke Immunität gegen eine spätere Infektion entwickeln, sollte die Entwicklung eines wirksamen Impfschutzes möglich sein.

Die Impfung bzw. Immuntherapie von Leishmaniose, deren Ursache intrazelluläre Parasiten sind, sollte durch die Erzeugung einer Th1-typischen Immunreaktion mög-

- 2 -

lich sein. Im Stand der Technik wird vielfach auf die Bedeutung der Erzeugung einer Th1-Antwort in der Therapie oder Prävention von Leishmaniose hingewiesen. (Handman et al., J Immunol 160: 3949-57, Gurunathan et al., Nature Med: 4( 12): 1409-15). Zur Förderung der Auslösung einer Th1-typischen Immunantwort wird auf 5 das kostimulatorische Zytokin IL-12 als unerlässliches Adjuvant verwiesen (Parker et al., J. Immunol. 140: 896-902).

Zusätzlich können immunstimulatorische Nukleinsäuresequenzen (ISS) als Adjuvant eingesetzt werden. Die CpG-Motive der ISS bewirken eine Erhöhung der Aktivität von NK-Zellen und Makrophagen sowie eine starke Stimulation der zellulären 10 TH1-Immunantwort. Bevorzugt können kovalent geschlossene ISS mit einer Länge von 30 bp eingesetzt werden, wie sie beispielsweise in der EP 1 196 178 A1 beschrieben sind.

Verschiedene Antigene wurden in experimentellen Impfprotokollen in Mäusen getestet. Die immunologische Reaktion in Mäusen auf diese Infektion, scheint der im 15 Menschen und wahrscheinlich auch der in Hunden zu gleichen (Cox, Int. J. Parasitol. 263: 1147-1157). Verwendete Antigene waren das gp 63 (Scott et al., J. Exp Med. 168: 1675-1684), gp 46 (McMahon-Pratt et al., Infection and Immunity 61: 3351-3359), p-4 und p-8 (Scott et al., Immunology 99: 615-624) sowie das p36 oder auch als LACK bezeichnete Antigen (Gonzales-Aseguinolaza et al., Eur. J. Biochem. 259: 909-916). Das erfolgreichste Impfregime, Erstimmunisation mit p36 Protein, Zweitimmunisation mit Vaccinia Virus, kodierend für p36 und IL-12, führte zu 20 einer durchschnittlichen Verkleinerung der Läsionen um 52% im Vergleich zu ungeimpften Mäusen (Gonzalo et al., Microbes and Infection: 3 (9): 701-711).

Neben einem nur 52%igem Schutz wurden in dem zitierten Versuch Vaccinia-Viren 25 als Genfären eingesetzt. Dabei handelt es sich um virale Vektoren, die auf Grund ihrer hohen Transfektionseffizienz immer noch die am häufigsten eingesetzten Genfären darstellen. Es ist jedoch bekannt, dass ein hohes Risiko einer zytotoxischen Reaktion des Wirtsorganismus auf die transfizierten Zellen besteht. So führte 30 die Anwendung einer hohen Dosis eines Adenovirus bei einem klinischen Versuch zum Tod des Patienten; offensichtlich war die Ursache dafür eine starke Überreaktion des Immunsystems (Lehrman, 1999, Nature 401: 517-518). Weiterhin ist durch

die Instabilität des attenuierten Impfstammes die Rückverwandlung in einen virulenten Stamm nicht auszuschließen. Außerdem können die viralen Bestandteile selbst immunogen wirken, was zu einer Herabsetzung ihrer Wirksamkeit durch das Immunsystems des Patienten führt.

- 5 In eigenen Arbeiten der Anmelderin wurden BALB/c Mäuse mit minimalistischen Expressionsvektoren kodierend für das p36 LACK-Antigen immunisiert. Dabei wurden verschiedene Impfschemata angewendet. Im Rahmen dieser Studie konnte in einer Gruppe ein 57%iger Schutz vor einer Infektion mit *Leishmania major* erreicht werden (L. Lopez-Fuertes et al., 2002, Vaccine 21: 247-257).
- 10 Gurunathan et al. setzten das p36 LACK-Antigen, durch eukaryotische Expressionsvektoren kodiert, in Impfversuchen in Mäusen ein (J. Exp. Med., Vol 186, No. 7, (1997): 1137-1147).

In anderen Ansätzen wurden verschiedene Antigenkombinationen eingesetzt. Mit einem Gemisch an Plasmid-DNA, kodierend für TSA und LmST11, konnte so die 15 Größe der Läsionen über einen bestimmten Zeitraum nach der Infektion kleingehalten werden (A. Campos-Neto et al., 2002, Infection and Immunity: 2828-2836).

Die Dreierkombination der Antigene LACK, LmST11 und TSA konnte das Auftreten von dermalen Läsionen nach der Infektion zum großen Teil verhindern und führte zu einem über mehrere Wochen anhaltenden Schutz (S. Mendez et al., 2001, J. of Immunology 166: 5122-5128).

Allen zitierten Versuchen ist gemeinsam, dass durch sie nur ein teilweiser und damit unzureichender Schutz vor einer Infektion mit Leishmaniose erreichbar war. Ebenso wurden die Impfstoffkombinationen nachteilhafterweise nicht in Hunden, dem Hauptüberträger, sondern in Mäusen erprobt. Ein weiterer Nachteil ist, dass die eingesetzten Genfären Plasmide sind. Plasmide werden durch bakterielle Fermentation gewonnen. Dadurch enthalten sie neben dem gewünschten Gen auch die für ihre Vervielfältigung und Selektion notwendige DNA, üblicherweise Resistenzgene gegen bei der Fermentation verwendete Antibiotika. Bei der Verwendung von Genexpressionskonstrukten auf Basis von Plasmid-DNA besteht dadurch das inhären-

- 4 -

te Risiko der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen, welches insbesondere bei Schutzimpfungskampagnen nicht vertretbar ist. In der medizinischen Praxis stehen die beschriebenen Nachteile plasmidbasierter Expressionsvektoren ihrer breiten Anwendung massiv entgegen.

- 5 Ausgehend von diesem Stand der Technik ist es daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein DNA-Expressionskonstrukt bzw. auch mehrere DNA-Expressionskonstrukte zur Verfügung zu stellen, welche zur Herstellung eines Arzneimittels zur effizienten Immunisierung gegen Leishmaniose verwendet werden können.
- 10 Die Aufgabe wird durch die Merkmale der unabhängigen Ansprüche gelöst.

Als DNA-Expressionskonstrukte werden bevorzugt werden erfindungsgemäß minimalistische, immunologisch definierte Genexpressionskonstrukte verwendet, die im Folgenden als MIDGE-Vektoren bezeichnet werden (MIDGE®: MINIMALISTIC IMMUNOLOGICALLY DEFINED GENE EXPRESSION VECTORS, vgl. EP 0 941 15 318 B1, US 6,451,593 B1). Die MIDGE-Vektoren haben den Vorteil, dass durch sie auf Strukturen verzichtet werden kann, die für die therapeutische Wirkung nicht essentiell sind.

Erfindungsgemäß ist insbesondere vorgesehen, dass das immunogene Antigen *p36 LACK* in Kombination mit dem *Leishmania infantum thiol-specific antioxidant protein* 20 Antigen (TSA), dem *Leishmania infantum kinetoplastid membrane protein 11* Antigen (Kmp-11) und dem *Leishmania infantum Glycoprotein 63* (gp63) Antigen zur Erzeugung einer Immunantwort verwendet wird.

Infolgedessen ist die Verwendung eines DNA-Expressionskonstrukt zur Herstellung eines Arzneimittels zur Immunisierung gegen Leishmaniose-Infektionen vorgesehen, wobei besagtes DNA-Expressionskonstrukt ein oder mehrere kodierende Nukleinsäuresequenzen enthält, welche zur Expression der *Leishmania infantum* Antigene *thiol-specific antioxidant protein Gen* (TSA), Glycoprotein gp63 und *kinetoplastid membrane protein 11* (Kmp-11) oder von Allelen oder Derivaten davon mit entsprechender Funktion führen.

- 5 -

Bevorzugt ist aber auch die Verwendung von zwei oder drei DNA-Expressionskonstrukten zur Herstellung eines Arzneimittels zur Immunisierung gegen Leishmaniose-Infektionen, wobei besagte DNA-Expressionskonstrukte jeweils ein oder mehrere kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, die gemeinsam zur

5 Expression der *Leishmania infantum* Antigene *thiol-specific antioxidant protein Gen* (TSA), Glykoprotein gp63 und *kinetoplastid membrane protein 11* (Kmp-11) oder von Allelen oder Derivaten davon mit entsprechender Funktion führen.

Erfnungsgemäß ist vorgesehen, dass wenigstens zwei der *Leishmania infantum* Antigene als Fusionsprotein exprimiert werden. Dabei kann es sich einerseits um

10 das Fusionsprotein - als Expressionsprodukt - aus *thiol-specific antioxidant protein Gen* (TSA) und *kinetoplastid membrane protein 11 Gen* (Kmp-11), oder einer Kombination derselben, handeln. Dementsprechend ist auch im Hinblick auf die drei unterschiedlichen *Leishmania infantum* Antigene ein Fusionsprotein – als Expressionsprodukt - aus *thiol-specific antioxidant protein Gen* (TSA), Glykoprotein gp63

15 Gen und *kinetoplastid membrane protein 11 Gen* (Kmp-11), oder einer Kombination derselben, bevorzugt.

Unter „einer Kombination derselben“ wird hierbei verstanden, dass jedwede Reihenfolge/Ausrichtung der Gene bzw. der Leserichtung verstanden wird, also z.B. [TSA - KMP-11], aber auch [Kmp-11 – TSA], bzw. [TSA – gp63 – Kmp-11] oder (TSA –

20 Kmp-11 – gp63] oder [Kmp-11 – TSA – gp63] usw. usw..

Es ist demnach also ebenfalls ein Genexpressionskonstrukt kodierend für gegebenenfalls unterschiedliche Fusionsproteine vorgesehen. Das Fusionsprotein besteht wie beschrieben aus einer Kombination von mindestens zwei der benannten Antigene (TSA, Kmp-11). Das Bifusionsprotein wird alleine oder in Kombination mit dem

25 Antigen gp 63 eingesetzt.

Das Fusionsprotein kann jedoch auch wie beschrieben aus drei Antigenen bestehen. Es handelt sich dann um eine Kombination der Antigene TSA, Kmp-11 und gp63.

- 6 -

Ferner ist eine Verwendung bevorzugt, wobei zusätzlich zu den beschriebenen DNA-Expressionsprodukten – gleichgültig ob dabei Fusionsproteine exprimiert werden oder nicht – ein DNA-Expressionskonstrukt zur Expression des Leishmania Antigen p36 LACK oder eines Allels oder Derivates davon mit entsprechender Funktion enthalten ist. Das p36 LACK Antigen kann demnach diesem Cocktail optional zugesetzt werden.

Unter einem „Allel oder Derivat davon mit entsprechender Funktion“ wird im Sinne der Erfindung verstanden, dass es sich auch um homologe Sequenzen handeln kann, wobei der Homologiegrad insoweit unbeachtlich ist, als das dieselbe Funktion den betreffenden Gens gewährleistet und erhalten bleibt.

Als Genfähre wird eine linear-doppelsträngige kovalent geschlossene MIDGE-Expressionskassette verwendet. Die immunisierenden Polynukleotidsequenzen liegen als Expressionskonstrukte vor, die aus kovalent geschlossenen linearen Desoxyribonukleinsäuremolekülen bestehen, welche einen linearen Doppelstrangbereich aufweisen, wobei die doppelstrangbildenden Einzelstränge durch kurze einzelsträngige Schlaufen aus Desoxyribonukleinsäurenucléotiden verknüpft sind, wobei die doppelstrangbildenden Einzelstränge nur aus der kodierenden Sequenz unter Kontrolle eines im zu impfenden Tier operablen Promoters und einer Terminatorsequenz bestehen. Die Expressionskassette besteht also aus der kodierenden Sequenz, dem Promotor und gegebenenfalls einer Terminationssequenz, so dass das Konstrukt nur die für die Expression des gewünschten Gens notwendige Information enthält, was letztlich die Nachteile der Genfährten viralen Ursprungs vermeidet. Ferner ist erfindungsgemäß vorgesehen, dass das (oder die) DNA-Expressionskonstrukt(e) zur Steigerung der Transfektionseffizienz jeweils mit einem Oligopeptid aus 3 bis 30 Aminosäuren konjugiert ist, wobei das Oligopeptid zur Hälfte aus basischen Aminosäuren aus der Gruppe Arginin und Lysin besteht. Besonders bevorzugt ist eine Kernlokalisationssequenz, insbesondere

- die ein Kern-Lokalisierungssignal (Nuclear Localization Signal = NLS) darstellende Peptidsequenz PKKKRKV (Prolin-Lysin-Lysin-Lysin-Arginin-Lysin-Valin) aus dem Simian Virus SV-40. Speziell für das SV-40-NLS wurde gezeigt, dass Proteine bis zu 465 kDa zum Zellkern gesteuert werden (Lanford

- 7 -

et al. 1986, Cell 15; 46 (4): 575-82). Diese Fähigkeit des Peptids wurde hier durch Kopplung an DNA für die Verbesserung des Gentransfers genutzt.

- oder das elf Aminosäuren lange T-Peptidfragment YGRKKRRQRRR des HIV-1 Genprodukts TAT.

5 Es sind demnach Proteine, die die Transfektionseffizienz von DNA Impfstoffen verstärken, beispielsweise kationische Peptide und Proteine, als Bestandteil der Expressionskonstrukte bevorzugt.

Die kodierenden Polynukleotidsequenzen können auch in einem zirkulär doppelsträngigen Expressionsvektor vorliegen.

10 Es ist bekannt, daß durch Optimierung der Kodonbenutzung (Codon Usage Optimization) innerhalb des Expressionskonstruktus an die präferentiell in Säugern benutzten Kodons die Expression von Proteinen erheblich gesteigert werden kann (Grantham et al., Nucleic Acids Res 1980, 9:1893-912). Um mehr Antigen in-vivo zu exprimieren und damit eine stärkere Immunantwort auszulösen, die sich in einem  
15 wirksamen und dauerhaften Schutz vor der Infektion mit Leishmaniose zeigt, wurde die Wildtyp Sequenz von gp63 optimiert. Unter Optimierung soll die Kodon-Anpassung, auch als "Codon-Usage-Optimization" bezeichnet, verstanden werden. Dazu wurde eine Klonierungsstrategie entwickelt, die die Synthese dieser optimierten DNA-Sequenz des gp63 aus Oligonukleotiden ermöglichte.

20 Erfindungsgemäß wurde die Sequenz des Leishmania infantum gp63 Antigens daher kodonoptimiert (Seq.ID 5). Ein DNA-Expressionskonstrukt, welches diese Sequenz aufweist, ist mithin ebenfalls bevorzugt.

25 Die erfindungsgemäßen DNA-Expressionskonstrukte dienen zur Herstellung eines Impfstoffes zur Behandlung von Leishmaniose-Infektionskrankheiten und sind Bestandteil einer entsprechenden Vakzine.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung kann die Vakzine immunstimulatorische Nukleinsäuresequenzen (ISS) umfassen. Die immunstimula-

- 8 -

torischen Nukleinsäuresequenzen, CpG Motive enthaltend, umfassen einen zirkulären Strang Desoxyribonukleinsäure mit einer teilweise zueinander komplementären, antiparallelen Basensequenz. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die immunstimulatorischen Nukleinsäuresequenzen hantelförmig.

5 Ebenso ist die Kombination des erfindungsgemäßen Impfstoffes mit transfektionsverbessernden Verbindungen, wie beispielsweise PEI (Polyethylenimin), denkbar.

Zur Transfektion können biologische, chemische und/oder physikalische Methoden eingesetzt werden, die zum Stand der Technik gehören, beispielsweise Transfektion mittels ballistischem Transfer oder Elektroporation. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Transfektion mittels intradermaler Injektion durch Spritzen oder nadelfreier Injektionsgeräte.

10 Das beigefügte Sequenzprotokoll, welches Bestandteil der Anmeldung und vorliegender Beschreibung ist, gibt folgende Sequenzen wieder.

	<u>Seq.ID</u>	<u>Sequenzname/-beschreibung</u>
15	Seq.ID 1	DNA-Sequenz des Leishmania infantum <i>kinetoplastid membrane protein 11</i> Ggens (Kmp-11)
	Seq.ID 2	Protein-Sequenz des Leishmania infantum <i>kinetoplastid membrane protein 11</i> Antigens (Kmp-11)
20	Seq.ID 3	DNA-Sequenz des Leishmania infantum <i>thiol-specific antioxidant protein</i> Gens (TSA)
	Seq.ID 4	Protein-Sequenz des Leishmania infantum <i>thiol-specific antioxidant protein</i> Antigens (TSA)
	Seq.ID 5	DNA-Sequenz des kodon-optimierten Leishmania infantum Antigens <i>Glycoprotein 63</i> (gp63)
25	Seq.ID 6	Protein-Sequenz des kodon-optimierten Leishmania infantum Antigens <i>Glycoprotein 63</i> (gp63)

- 9 -

- Seq.ID 7 DNA-Sequenz Leishmania infantum Antigen *p36* (LACK)
- Seq.ID 8 Protein-Sequenz Leishmania infantum Antigen *p36* (LACK)
- Seq.ID 9 Kernlokalisationssequenz (Peptidsequenz) des SV40
- Seq.ID 10 Langes T-Peptidfragment des HIV-1 Genprodukts TAT  
5 (TAT-Peptid)

Seq.ID 11 bis Seq.ID 36 synthetische DNA-Oligomere wie unten beschrieben.

Weitere vorteilhafte Maßnahmen sind in den übrigen Unteransprüchen enthalten. Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Figuren und Ausführungsbeispielen näher beschrieben und diskutiert.

- 10 Die überraschende Wirkung der erfindungsgemäßen Kombination von DNA-Expressionskonstrukten und eines Arzneimittels, welches eine solche Kombination enthält, wird anhand der Darstellungen gem. der Figuren deutlich. Dabei bedeuten:

- MIDGE-NLS p36 mit NLS gekoppelter MIDGE kodierend für das p36 LACK Antigen
- 15 MIDGE-NLS TSA mit NLS gekoppelter MIDGE kodierend für das TSA Antigen
- MIDGE-NLS gp63 mit NLS gekoppelter MIDGE kodierend für das gp63 Antigen
- MIDGE-NLS Kmp-11 mit NLS gekoppelter MIDGE kodierend für das Kmp-11 Antigen
- pMCVp36 Plasmid kodierend für p36 LACK Antigen
- 20 pMCV TSA Plasmid kodierend für TSA Antigen
- pMCV gp63 Plasmid kodierend für gp63 Antigen
- pMCV Kmp-11 Plasmid kodierend für Kmp-11 Antigen

Es zeigt:

- Fig. 1: Die Entwicklung der Läsionen in Woche 8 nach der Belastungsinfektion in  
25 Mäusen. Hierin bedeuten:

- L+K: LACK in Kombination mit Kmp-11
- L+T: LACK in Kombination mit TSA
- L+G: LACK in Kombination mit gp 63

- 10 -

K+T: Kmp-11 in Kombination mit TSA

K+G: Kmp-11 in Kombination mit gp 63

T+G: TSA in Kombination mit gp 63

5 T+G+L: TSA in Kombination mit gp 63 und LACK

T+G+K: TSA in Kombination mit gp 63 und Kmp-11

L+K+G: LACK in Kombination mit Kmp-11 und gp 63

L+K+T: LACK in Kombination mit Kmp-11 und TSA

10 T+G+L+K: TSA in Kombination mit gp 63, LACK und Kmp-11

PBS: Kontroll Gruppe: PBS

Die Fig. 1 zeigt die verschiedenen Kombinationen der eingesetzten Antigene in Mäusen. Die dortigen Punkte repräsentieren die Daten der einzelnen Tiere, während die waagerechten Balken den Mittelwert der entsprechenden Gruppe kennzeichnen. Die betreffenden Antigene wurden jeweils einzeln, in sechs verschiedenen Zweierkombinationen, in vier verschiedenen Dreierkombinationen und in einer Viererkombination eingesetzt. Als relevanter Parameter für den klinischen Erfolg der Impfung wurde das Wachstum der infektionsbedingten Läsionen in der infizierten Hinterpfote der Tiere gemessen.

15 Die Größenzunahme der Läsionen ist auf der Ordinate in Millimeter aufgetragen. Auf der Abszisse sind die verschiedenen Antigenkombinationen dargestellt. Dabei zeigt sich, dass in der Gruppe der Zweierkombinationen die Kombination von TSA mit gp 63 den besten Impfschutz bietet. Den nächstbesten Schutz bietet die Kombination LACK mit TSA. In der Gruppe der Dreierkombinationen bietet die Gruppe LACK, Kmp-11, TSA den besten Schutz. Die erreichte Impfwirkung zeigt sich in der deutlich verringerten Größe der gebildeten Läsionen. Den zweitbesten Impfschutz bietet die Kombination der Antigene TSA, gp 63 und Kmp-11. In dieser Gruppe wird im Mittel eine Läsionsgröße von 0,4 Millimeter erreicht. Der Wert von 0,5 Millimeter stellt jedoch den Schwellenwert dar, ab dem Läsionen für das menschliche Auge deutlich wahrnehmbar und auswertbar sind. Das bedeutet, dass die Tiere, die mit der Kombination TSA, gp 63 und Kmp-11 wurden, per Definition keine Läsionen zeigten bzw. die festgestellten unter der Nachweisgrenze

20

25

30

- 11 -

lagen. Im Vergleich dazu weisen die unbehandelten Mäuse der Kontrollgruppe eine Läsionsgröße von 1,7 Millimetern im Durchschnitt auf. Ebenso trat bei diesen Tieren eine starke Schwellung und Rötung der Pfoten auf, Symptome, die ebenfalls nicht in den geschützten Gruppen zu beobachten waren  
5 und deutliche Entzündungszeichen infolge der Infektion darstellen.

**Fig. 2:** Die Bestimmung des Gesamt IgG Titer im Zieltier Hund vor der Belastungsinfektion mit Leishmania infantum Promastigoten. Hierin bedeuten:

- Gruppe 1: MIDGE-NLSp36 LACK
- Gruppe 2: MIDGE-NLS 4-Antigen-Kombination
- 10 Gruppe 3: Plasmid 4-Antigen-Kombination
- Gruppe 4: Kontroll-Gruppe: PBS

Die Punkte repräsentieren die Daten der einzelnen Hunde, während die waagerechten Balken den Mittelwert der entsprechenden Gruppe kennzeichnen. Die optische Dichte (OD) steigt mit der Konzentration der Serum-Antikörper. In Figur 2 ist ein deutlicher Unterschied zwischen den Konzentrationen der Anti-Leishmania-Antikörper der Gruppen 1 und 2 einerseits und den Gruppen 3 und 4 andererseits sichtbar. Die Hunde der Gruppe 1, die mit MIDGE-NLS-LACK geimpft wurden, und die Hunde der Gruppe 2, die die Kombination der vier Antigen-Sequenzen in MIDGE-NLS erhalten hatten,  
15 besaßen mehr Antikörper gegen Leishmania infantum als die Gruppen 3 und 4. Bemerkenswert ist, daß in Gruppe 3 keine Antikörper nachweisbar waren, obwohl die gleichen Antigen-Sequenzen wie in Gruppe 2 verwendet wurden. Dies zeigt, daß die Kombination der vier Antigensequenzen besonders in Verbindung mit MIDGE-NLS-Vektoren zur Induktion einer humoralen Immunantwort geeignet ist. Auch im Vergleich zur Gruppe 1 besaßen die Hunde der Gruppe 2 durchschnittlich mehr Antikörper. Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß die Kombination der vier Antigene einen Vorteil gegenüber der alleinigen Verabreichung von LACK darstellt.  
20  
. 25

Im Folgenden wird näher auf die Versuchsergebnisse eingegangen; im Einzelnen:

30 In einem Impfversuch in Mäusen wurden verschiedene Kombinationen der eingesetzten Antigene auf ihre Wirksamkeit, einen möglichst hohen Schutz gegen Infekti-

- 12 -

onen mit Leishmaniose zu erreichen, getestet. Als Parameter für eine erzielte Schutzwirkung wurde die Unterdrückung des Läsionswachstums durch die eingesetzten Vakzinekombinationen benutzt. Zur Beurteilung der Schutzwirkung wurde eine Belastungsinfektion mit Leishmania infantum Promastigoten durchgeführt. Die 5 Beurteilung des Läsionswachstums erfolgte wöchentlich. Die Ergebnisse in Figur 1 stammen aus Woche acht nach der Belastungsinfektion. Grundsätzlich entwickelten alle Tiere, die mit einem Antigen oder einer Zweierkombination der Antigene geimpft wurden, früher Läsionen als die Tiere, die mit einer Dreier- oder Viererkombination der Antigene geimpft wurden. Ein guter Impferfolg wurde mit der Dreikombination 10 der Antigene Kmp-11, TSA und p36 LACK erreicht. Eine vergleichbare Schutzwirkung wurde mit der Antigenkombination TSA, gp63 und Kmp-11 erreicht. Der überraschende Impferfolg wird darin sichtbar, das bei beiden erfolgreichen Dreierkombinationen (TSA, gp 63, Kmp-11 und p36 LACK, Kmp-11, gp 63) die Größe der Läsionen unterhalb der Nachweisgrenze von 0,5 Millimetern liegen und sich somit keine 15 auswertbaren Läsionen entwickelten. Damit ist die Läsionsgröße bei den geimpften Tieren um 100% kleiner als bei der ungeimpften Kontrollgruppe.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Antigenkombinationen in einem Immunisierungsversuch in Mäusen.

<u>Gruppe</u>	<u>Anzahl Tiere</u>	<u>Menge an DNA [in Mikrogramm]</u>
1. MIDGE-NLS-p36 LACK+Kmp-11	9	50
2. MIDGE-NLS-p36 LACK+TSA	9	50
3. MIDGE-NLS-p36 LACK+gp 63	9	50
4. MIDGE-NLS-Kmp11+TSA	9	50
5. MIDGE-NLS-Kmp11+gp 63	9	50
6. MIDGE-NLS-TSA+gp 63	9	50
7. MIDGE-NLS-TSA+gp 63+p36 LACK	9	50
8. MIDGE-NLS TSA+gp 63+p36 LACK+Kmp-11	9	50
9. MIDGE-NLS p36 LACK	9	50
10. MIDGE-NLS TSA	9	50
11. MIDGE-NLS Kmp-11	9	50
12. MIDGE-NLS gp 63	9	50

- 13 -

13. MIDGE-NLS TSA+gp 63+Kmp-11	9	50
14. MIDGE-NLS p36 LACK+Kmp-11+gp 63	9	50
15. MIDGE-NLS p36 LACK+Kmp-11+TSA	9	50
17. PBS	9	50

Je Gruppe wurden neun weibliche Balb/c Mäuse eingesetzt. Die Tiere wurden mit 50 Mikrogramm DNA geimpft. In den Antigenkombinationen betrug die Menge an eingesetzter DNA 50 Mikrogramm pro Antigen. Nach zwei Wochen erfolgte die Zweitimmunisierung (boost). Drei Wochen nach dem Boost erfolgte die Belastungs-

- 5 infektion mit  $5 \times 10^4$  Leishmania infantum Promastigoten, die sich in der stationären metazyklischen Phase befanden. Diese wurden den Tieren subkutan in die rechte Hinterpfote injiziert. Der Stand der Infektion wurde wöchentlich verfolgt. Die Größe der Läsionen wurde mit einer elektronischen Schiebelehre durch Vergleich mit der linken unbehandelten Hinterpfote bestimmt. In einem Folge-Experiment in weiblichen 4-12 Monate alten Beagle Hunden wurden ebenfalls verschiedene Impfstoffzusammensetzungen formuliert, die sich in der verwendeten Antigenkombination unterschieden. Die Negativkontrolle, Gruppe 4, erhielt nur PBS-Puffer und diente als Infektionskontrollgruppe. Die Gruppe 1 bestand aus nur einem Antigen, dem p36 LACK Antigen. Dieses Antigen hat in früheren Versuchen zu gutem Schutz geführt
- 10 und sollte im Zieltier Hund überprüft werden (L. Lopez-Fuertes et al., 2002, Vaccine 21: 247-257). Die Gruppe 3 bestand aus verschiedenen Plasmiden kodierend für die Leishmania infantum Antigene: TSA, Kmp-11, gp63 und p36 LACK. Diese Gruppe dient zum Vektor- und Wirkungsvergleich mit Gruppe 2, die aus dergleichen Antigenkombination bestand, jedoch peptidgekoppelte MIDGE als Vektoren beinhaltet.
- 15
- 20 Es wurden 4 Impfgruppen mit jeweils 6 Tieren zusammengestellt, die in 15-tägigem Abstand viermal intradermal mit jeweils 200 Mikrogramm DNA pro Konstrukt immunisiert wurden (siehe Tabelle 3). Vor dem Beginn des Experimentes und nach jeder Immunisierung wurde den Tieren, neben routinemäßigen veterinärmedizinischen Untersuchungen, Blut für serologische Untersuchungen abgenommen.
- 25 Um festzustellen, welcher Art der Immunantwort durch die Impfung oder eine Infektion erzeugt wurde, sind verschiedene Methoden anwendbar. Zu den Methoden, die den Rückschluss auf eine zelluläre Immunantwort zulassen, gehört der Test auf "verzögerte Überempfindlichkeit" der auch als "Delayed Type Hypersensitivity"-Test

- 14 -

(DTH-Test) bezeichnet wird. Durch Messung der Hautdicke an der Injektionsstelle 72 Stunden nach der Antigen-Applikation kann relativ genau bestimmt werden, ob eine verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion und damit eine spezifische T-Zell-Reaktion auf das Antigen erfolgte. Die Ergebnisse sind nachfolgend in Tabelle 2  
 5 dargestellt:

Tabelle 2

<u>Gruppe</u>	<u>Hunde</u>	<u>DTH-Test</u>	<u>DTH-Test</u>
		<u>vor Impfung</u>	<u>nach Impfung</u>
MIDGE-NLSp36 LACK	1	-	+
	2	-	-
	3	-	-
	4	-	+
	5	-	-
	6	-	-
MIDGE-NLS	1	-	+
	2	-	+
	3	-	+ (?)
	4	-	-
	5	-	+
	6	-	+
Plasmid	1	-	+
	2	-	+
	3	-	-
	4	-	++
	5	-	-
	6	-	+
TSA, p36 LACK, Kmp11, gp36	1	-	-
	2	-	+
	3	-	-
	4	-	++
	5	-	-
	6	-	+
PBS Puffer	1	-	-
	2	+	-
	3	-	+
	4	-	+ (?)
	5	-	- (?)
	6	-	-

- 15 -

Die Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse des Tests auf "verzögerte Überempfindlichkeit" der auch als "Delayed Type Hypersensitivity"-Test (DTH-Test) bezeichnet wird. Eine lokale Hautschwellung wird als positiver DTH-Test bewertet (in der Abbildung mit "+" oder "++" gekennzeichnet) und zeigt an, daß das betreffende Tier antigen-  
5 spezifische T-Gedächtniszellen infolge der Impfung ausgebildet und somit eine zelluläre Immunantwort stattgefunden hat. Wie beschrieben ist die zelluläre Immun-  
antwort entscheidend in der Prophylaxe und Therapie von Leishmaniose Erkran-  
kungen. Vor Beginn des Experimentes wurde der DTH durchgeführt, um sicherzu-  
stellen, dass keines der Versuchstiere bereits eine zelluläre Immunantwort gegen L.  
10 infantum infolge einer früheren Infektion/Impfung ausgebildet hatte. Alle Tiere, bis auf eines, reagierten im DTH Test negativ und erfüllten damit die Voraussetzung für den Versuch. Eine positive Reaktion nach Abschluß der Immunisierung bedeutet, dass die Immunisierung eine spezifische zelluläre Immunantwort gegen Leishmania infantum erzeugt hat. Das ist als Impferfolg zu werten und läßt einen besseren  
15 Schutz gegen Infektionen erwarten.

Nach der letzten Impfung wurde wieder ein DTH Test durchgeführt. Hier erwartete man, dass möglichst alle geimpften Tiere positiv reagierten. Da das zuvor positive Tier nun negativ reagierte, ist davon auszugehen, das es auch schon in dem ersten DTH Test negativ war und es sich um einen Fehler in der Interpretation des Ergebnisses handelte.  
20

Die durch die Impfungen erzeugte Immunantwort wurde zusätzlich durch serologische Untersuchungen charakterisiert. In Fig. 2 sind die Ergebnisse des ELISA-Nachweises von spezifischen Antikörpern gegen Leishmania infantum im Serum der immunisierten Hunde dargestellt. Insgesamt waren die Antikörperkonzentrationen in  
25 den Seren der geimpften Hunde nicht sehr hoch. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da die Immunisierung mehr auf eine zelluläre als auf eine humorale Immunantwort abzielte.

- 16 -

**Tabelle 3:** Zusammensetzung der Impfgruppen im Immunisierungsversuch gegen Leishmania infantum in Hunden

<u>Gruppe</u>	<u>Verwendetes Antigen</u>	<u>Anzahl</u>	<u>Menge an</u>	<u>Appliziertes</u>
		<u>Tiere</u>	<u>DNA</u>	<u>Volumen</u>
1	MIDGE-NLSp36 LACK	6	200 µg pro Konstrukt	500 µl pro Tier
2	MIDGE-NLS-TSA, MIDGE-NLS-Kmp-11, MIDGE-NLS-gp63, MIDGE-NLS-p36 LACK	6	200 µg pro Konstrukt	500 µl pro Tier
3	pMCV-TSA, pMVC-Kmp-11, pMCV-gp63, pMCV-p36 LACKMIDGE	6	200 µg	500 µl pro Tier
4	PBS Puffer	6	-	500 µl pro Tier

Der Erfolg der Immunisierung wird beschreibbar durch eine Belastungsreaktion der Tiere mit dem Erreger. Vier Wochen nach der letzten Immunisierung fand deshalb 5 intravenös eine Belastungsinfektion mit  $5 \times 10^7$  Leishmania infantum Promastigoten statt. Der Grad der Infektion und damit der durch die Impfung erreichte Schutz, wird anhand klinisch-pathologischer Untersuchungen festgestellt. Zu diesen zählen die Untersuchung auf Schwellung der Lymphknoten in der Kniekehle, Gewichtsverlust, Rückbildung mit einhergehender Veränderung der Farbe der Muskeln, überschließendes Nagelwachstum, Läsionen der Haut sowie Veränderungen im Hämogramm. Das Vorhandensein und die Quantität des Erregers werden durch eine quantitative PCR-Reaktion bestimmt. Bei Vergleich der Gruppen 11 Monate nach der Belastungsinfektion in Bezug auf die Ausbildung klinischer Symptome ergibt sich folgendes Bild: Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen Gruppe 2 und der Kontrollgruppe erkennbar. In Gruppe 2 erkrankte nur 1 Hund an Leishmaniose, während in der Kontrollgruppe 4 von 6 Hunden an Leishmaniose erkrankten. Auch in der Gruppe 1 war die Anzahl erkrankter Hunde gegenüber der Kontrollgruppe deutlich reduziert, während Gruppe 3 nur einen geringen Unterschied zur Kontrollgruppe aufwies. Der direkte Vergleich der Wirkung von MIDGE-NLS mit Plasmid kodierend für exakt die gleichen Antigene, (Gruppe 2 und Gruppe 3) zeigt, das mit MIDGE-NLS ein besse-

rer Schutz gegen Leishmaniose erzielt wurde, als es mit Plasmid möglich war. Die Versuchsergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, das die Immunisierung von Hunden gegen Leishmaniose mit einer Kombination aus den vier MIDGE -NLS kodierten Antigenen, die Entwicklung klinischer Symptome der Leishmaniose in Hunden verhindern kann. Nach dem Erkenntnisstand der Anmelder ist ein vergleichbar gutes Ergebnis, wie es mit dem erfindungsgemäßen Impfstoff MIDGE-NLS kodierend für 4 Antigene erzielt wurde, bisher nur von Ramiro et al., (Vaccine 3696, 2003: 1-11) beschrieben worden. Im Unterschied zu MIDGE-NLS ist jedoch in der Studie von Ramiro et al., ein rekombinanter Vaccinia Virus (rVV) als Boostimpfstoff verwendet worden. Bei dem rekombinaten Vaccinia Virus handelt es sich um genetisch modifizierte Viren, die bekanntermaßen ein hohes Sicherheitsrisiko darstellen (Lehrman, 1999, Nature 401: 517-518).

#### Ausführungsbeispiele

##### Beispiel 1: Klonierung des Plasmids pMCVp36

15 Vom Ausgangsplasmid pSCp36 wurden 2 Fragmente mittels PCR amplifiziert:

1. PCR ca. 800 bp;

Primer links: 5'-TTATATGGTACCATGAACATACGAGGGTCACCT

Primer rechts: 5'-TTATATGAGCTCAGAACACGGACAGGGACCTTCCGTCG

2. PCR ca. 950 bp;

20 Primer links: 5'-TTATATGGTACCATGAACATACGAGGGTCACCT,

Primer rechts: 5'-TTATATGAGCTCTACTCGGCCGTGGAGATGG

Das PCR-Produkt aus der 2. PCR wurde mit Eco31I geschnitten und das kleinere Fragment (ca. 200 bp) isoliert.

Das PCR-Produkt aus der 1. PCR wurde mit Bpil geschnitten.

- 18 -

Das 200 bp Fragment und das geschnittene Fragment aus der 1. PCR wurden zusammengefügert und anschließend mit KpnI und SacI geschnitten und in den mit KpnI und SacI geschnittenen pMOK-Vektor ligiert. Das entstandene Plasmid erhielt den Namen pMCVp36.

5    Beispiel 2: Klonierung des Plasmids pMCVKmp-11

Das Gen wurde mittels PCR aus cDNA von Leishmania infantum amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde nach Verdau mit KpnI und Xhol in den ebenso geschnittenen Vektor pMCV1.4 kloniert und sequenziert. Das entstandene Plasmid wurde pMCVKpm11 genannt.

10    Primer links:        5'-ATTATAGGTACCATGGCCACCACGTACGAG  
Primer rechts :        5'-TTAATTCTCGAGTTACTGGATGGGTACTGCG

Beispiel 3: Klonierung des Plasmids pMCVTSA

Das Gen wurde mittels PCR aus cDNA von Leishmania infantum amplifiziert und durch einfügen eines Basenaustausches, ohne die Aminosäuresequenz zu verändern, eine Eco31I-Erkennungssequenz entfernt. Das abschließende PCR-Produkt 15 wurde nach Verdau mit KpnI und Xhol in den ebenso geschnittenen Vektor pMCV1.4 kloniert und sequenziert. Das entstandene Plasmid wurde pMCVTSA genannt.

linker Primer: 5'-AATTATGGTACCATGTCCTGCGGTAACGCCAAGATC  
20    rechter Primer: 5'-AATATACTCGAGTTACTGCTTGCTGAAGTATCCTTCGAC

linker Mutationsprimer:        5'-TACCGCGGTCTCTCATCATCG  
rechter Mutationsprimer:      5'-ATTGGGGGTCTCGATGAATAGACCGCGGTAGG

Beispiel 4: Klonierungsstrategie für die Codon-Usage Optimierung von gp63

Die Oligonukleotide wurden mit einer Länge zwischen 18 und 28 Basen bestellt 25 (MWG Biotech). Zweimal 90 Oligonukleotide, die jeweils den Vorwärts- und Rückwärtsstrang abbilden, wurden durch Annealing und Ligation miteinander verbunden. Die annealten Oligonukleotide erzeugten jeweils zwei 4-Basen Überhänge. Es wur-

- 19 -

de darauf geachtet, dass die Überhänge nur einmal vorkamen und nicht palindromisch waren. Die Oligonukleotide wurden annealt, indem die beiden einzelnen Oligonukleotide (Strang und Gegenstrang) mit Kinasepuffer versetzt auf ca. 80°C erhitzt wurden und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt wurden. Danach 5 wurde ATP und Polynukleotidkinase (PNK) zugegeben und die Oligonukleotide für eine Stunde phosphoryliert. Anschließend wurden im ersten Schritt jeweils benachbarte Oligonukleotide zusammengegeben und ligiert (Oligonukleotid 1+2, Oligonukleotid 3+4). Nach 1 h Ligation wurde ein Aliquot vom Ligationsansatz der Oligonukleotide 1+2 und ein Aliquot vom Ligationsansatz 3+4 zusammengegeben. Dies 10 wurde mit den verschiedenen Ligationsansätzen bis zu einer Länge des Ligationsproduktes von etwa 300bp durchgeführt. Ein Aliquot des jeweils letzten Ligationschrittes wurde als Template in eine PCR mit flankierenden Primern eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde in den TOPO-TA-Cloning Vektor (Invitrogen) zwischenkloniert und sequenziert. Dies erfolgte mit insgesamt sechs Fragmenten des kompletten Gens. Die sechs einzelnen Fragmente wurden aus dem zwischenklonierten Plasmid mit Eco31I ausgeschnitten und miteinander ligiert. Das gesamte Ligationsprodukt richtiger Länge wurde in einer abschließenden PCR amplifiziert, mit KpnI und Sac I verdaut, und in den ebenso geschnittenen Vektor pMCV1.4 nach Gelextraktion kloniert. Anschließend wurde die Sequenz durch Sequenzierung kontrolliert. Das entstandene Plasmid wurde pMCVgp63 genannt.

Primer für die 6 zusammengesetzten Fragmente:

Fragment 1:

linker Primer: ATTATTGGTACCATGTCTGTGGACT

rechter Primer: TTATATGGTCTCTCAGGGCTCCCCAGTTG

25 Fragment 2:

linker Primer: ATTATAGGTCTCCTGAGAATTGCTGTGTCACAGAG

rechter Primer: TTATATGGTCTCACAGAGGCCACATACATCACAA

Fragment 3:

linker Primer: TATTATGGTCTCCTCTGTGCCCTTGAGGAGGGAGTGCTGGCC

30 rechter Primer: AATTATGGTCTCCTCAATCTCCAGGTACTCCAGG

- 20 -

Fragment 4:

linker Primer: ATTATAGGTCTCATTGAGGACCAGGGAGGAG  
rechter Primer: TAATATGGTCTCGTGTGGTCACTCCACACTTG

Fragment 5:

5 linker Primer: ATTATAGGTCTCAGACACCCAGACCTGCC  
rechter Primer: TTATATGGTCTCGGGGTGCAGTTGGCATAGCC

Fragment 6:

linker Primer: ATATATGGTCTCCACCCCAGGCCTGAGAGTGG  
rechter Primer: TAATATGAGCTCCTACAGGGCCACAGGCCAGCAGG

10 gesamte Sequenz:

linker Primer: ATTATTGGTACCATGTCTGTGGACT  
rechter Primer: TAATATGAGCTCCTACAGGGCCACAGGCCAGCAGG

Beispiel 5: Kopplung der NLS Sequenz an Oligonukleotide

Die NLS Kopplung wurden wie folgt vorgenommen: das NLS Peptid mit der Sequenz PKKKRKV wurde in zwei Schritten an die ODN's gekoppelt. Zuerst wurde das modifizierte Oligonukleotid 5'-PH-dGGG AGT CCA GT xT TTC TGG AC (wobei xT für aminomodifizierte Thyminbase mit C<sub>2</sub> – Amminolinker steht, = ODN 1) (0,1mM) mit sulfo-KMUS (5mM) in PBS bei Raumtemperatur (RT) aktiviert. Nach 120 min. wurde die Reaktion mit 50 mM Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethane gestoppt und das aktivierte ODN nach Ethanolpräzipitation (300mM NaOAc pH 5,2, 5,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 70 % Ethanol), Zentrifugation und einmaligem Waschen mit 70% Ethanol erhalten. Das so erhaltene ODN (0,1mM) wurde in PBS gelöst und reagierte mit dem Peptid (0,2mM) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Gelelektrophorese (3%) und Ethidiumbromidfärbung überprüft. Das entstandene NLS gekoppelte ODN wurde durch HPLC aufgereinigt und zur Synthese der MIDGE-NLS Antigen Konstrukte verwendet.

- 21 -

Beispiel 6: Herstellung der MIDGE-NLSp36

MIDGE sind lineare, kovalent geschlossene Expressionskassetten, die lediglich aus dem CMV Promotor, einem Intron, der entsprechenden Gensequenz und einer Polyadenylierungssequenz bestehen (vgl. EP 0 941 318 B1). Die Konstrukte wurden  
5 wie folgt erhalten: das unter Beispiel 1.1 beschriebene Plasmid pMCVp36 wurde mit Eco 31I vollständig verdaut. Die Ligation mit 5' phosphorylierten haarnadelförmigen Oligodesoxynukleotiden (ODN) 5'-PH-GGG AGT CCA GT XT TTC TGG AC (= ODN 1) und 5'-AGG GGT CCA GTT TTC TGG AC-3' (= ODN 2) durch T4 DNA Ligase in Anwesenheit von Eco 31I wurde durch Erhitzen auf 70°C gestoppt. Das resultierende  
10 Gemisch wurde konzentriert und mit Eco 31I und T7 DNA Ligase in Abwesenheit von Deoxyribonukleotid-Triphosphaten behandelt. Die Aufreinigung erfolgte durch Anionenaustauschchromatographie.

Die Herstellung von MIDGE-NLS-TSA, -Kmp-11 und gp63 erfolgte analog.

Beispiel 7: DHT Test

15 Test auf "verzögerte Überempfindlichkeit" der auch als "Delayed Type Hypersensitivity"-Test (DTH-Test) bezeichnet wird. Bei diesem Test wird dem geimpften Tier eine sehr kleine Menge Antigen in die obersten Hautschichten verabreicht. Zuvor wird die Hautdicke an der Applikationsstelle genau gemessen. Anschließend beobachtet man, ob sich die Haut an der Injektionsstelle entzündlich verändert. Charakteristisch für eine durch sensibilisierte T-Zellen hervorgerufene Immunreaktion auf  
20 das Antigen ist eine Entzündungsreaktion, die erst nach 48 bis 72 Stunden nachweisbar ist. Die klinischen Symptome, wie lokale Hautschwellung, Rötung und eventuell Schmerhaftigkeit, können auf die Wirkung von Zytokinen zurückgeführt werden.. Eine lokale Hautschwellung wird als positiver DTH-Test bewertet (in der Tabelle 1 mit "+" oder "++" gekennzeichnet) und zeigt an, daß das betreffende Tier antigen-spezifische T-Gedächtniszellen infolge der Impfung ausgebildet hat.  
25

Beispiel 8: Bestimmung Gesamt-Antikörper nach Immunisierung

In Fig. 2 sind die Ergebnisse des ELISA-Nachweises von spezifischen Antikörpern gegen *Leishmania infantum* im Serum der immunisierten Hunde dargestellt. Vor der

- 22 -

Belastungsinfektion wurden von allen Hunden die Seren gewonnen. Die Bestimmung des Gesamt IgG Antikörpertiter erfolgte mittels ELISA, wobei die Absorption in OD (Optische Dichte) bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 406$  nm bestimmt wurde.

**Patentansprüche**

1. Verwendung eines DNA-Expressionskonstruktes zur Herstellung eines Arzneimittels zur Immunisierung gegen Leishmaniose-Infektionen, wobei besagtes DNA-Expressionskonstrukt ein oder mehrere kodierende Nukleinsäuresequenzen enthält, welche zur Expression der *Leishmania infantum* Antigene *thiol-specific antioxidant protein Gen* (TSA), Glykoprotein gp63 und *kinetoplastid membrane protein 11* (Kmp-11) oder von Allelen oder Derivaten davon mit entsprechender Funktion führen.
2. Verwendung von zwei oder drei DNA-Expressionskonstrukten zur Herstellung eines Arzneimittels zur Immunisierung gegen Leishmaniose-Infektionen, wobei besagte DNA-Expressionskonstrukte jeweils ein oder mehrere kodierende Nukleinsäuresequenzen enthalten, die gemeinsam zur Expression der *Leishmania infantum* Antigene *thiol-specific antioxidant protein Gen* (TSA), Glykoprotein gp63 und *kinetoplastid membrane protein 11* (Kmp-11) oder von Allelen oder Derivaten davon mit entsprechender Funktion führen.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei wenigstens zwei der *Leishmania infantum* Antigene als Fusionsprotein exprimiert werden.
4. Verwendung nach Anspruch 3, wobei das Fusionsprotein das Expressionsprodukt aus *thiol-specific antioxidant protein Gen* (TSA) und *kinetoplastid membrane protein 11 Gen* (Kmp-11), oder einer Kombination derselben, ist.
5. Verwendung nach Anspruch 3 und 1, wobei das Fusionsprotein das Expressionsprodukt aus *thiol-specific antioxidant protein Gen* (TSA), Glykoprotein gp63 Gen und *kinetoplastid membrane protein 11 Gen* (Kmp-11), oder einer Kombination derselben, ist.
- 25 6. Verwendung nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei zusätzlich ein DNA-Expressionskonstrukt zur Expression des *Leishmania* Antigen p36 LACK oder eines Allels oder Derivates davon mit entsprechender Funktion enthalten ist.

7. Verwendung nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die kodierenden Polynukleotidsequenzen als Expressionskonstrukte vorliegen, die aus kovalent geschlossenen linearen Desoxyribonukleinsäuremolekülen bestehen, welche einen linearen Doppelstrangbereich aufweisen, wobei die doppelstrangbildenden Einzelstränge durch kurze einzelsträngige Schlaufen aus Desoxyribonukleinsäurenukleotiden verknüpft sind, wobei die doppelstrangbildenden Einzelstränge nur aus der kodierenden Sequenz unter Kontrolle eines im zu impfenden Tier operablen Promoters und einer Terminatorsequenz bestehen.
- 10 8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die kodierenden Polynukleotidsequenzen in einem zirkulär doppelsträngigen Expressionsvektor vorliegen.
- 15 9. Verwendung nach wenigstens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das DNA-Expressionskonstrukt zur Steigerung der Transfektionseffizienz mit einem oder mehreren Oligopeptiden kovalent verknüpft ist.
- 10 10. Verwendung nach wenigstens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die DNA-Expressionskonstrukte jeweils mit einem Oligopeptid aus 3 bis 30 Aminosäuren konjugiert sind, wobei das Oligopeptid zur Hälfte aus basischen Aminosäuren aus der Gruppe Arginin und Lysin besteht.
- 20 11. Verwendung nach 10, wobei die konjugierten Oligopeptide die Aminosäuresequenz YGRKKRRQRRR aufweisen.
12. Verwendung nach wenigstens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die linear-kovalent geschlossenen DNA-Expressionskonstrukte mit einem die Kernlokalisationssequenz (NLS) des large T-Antigens von SV40 enthaltenden Peptid mit der Aminosäuresequenz PKKKRKV modifiziert sind.
- 25 13. Verwendung der DNA-Expressionskonstrukte nach wenigstens einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung eines Impfstoffes zur Behandlung von Leishmaniose-Infektionskrankheiten.

14. Vakzine zur Behandlung von Leishmaniose-Infektionskrankheiten, enthaltend ein Arzneimittel nach Anspruch 13.
15. Vakzine nach Anspruch 14, welche zusätzlich Adjuvantien und/oder immunstimulatorische Nukleinsäuresequenzen mit einem oder mehreren CpG-Motiven enthält.  
5
16. Vakzine nach Anspruch 15, wobei die immunstimulatorische Nukleinsäuresequenzen als zirkulärer Strang Desoxyribonukleinsäure mit einer teilweise zueinander komplementären, antiparallelen Basensequenz vorliegen.
17. DNA-Expressionskonstrukt, enthaltend ein oder mehrere kodierende Nukleinsäuresequenzen, welche zur Expression der *Leishmania infantum* Antigene *thiol-specific antioxidant protein Gen* (TSA), Glykoprotein gp63 und *kinetoplastid membrane protein 11* (Kmp-11) oder von Allelen oder Derivaten davon mit entsprechender Funktion führen.  
10
18. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 17, wobei die Genprodukte oder Allele oder Derivate davon mit entsprechender Funktion als ein singuläres Fusionsprotein exprimiert werden.  
15
19. DNA-Expressionskonstrukt, enthaltend ein oder mehrere kodierende Nukleinsäuresequenzen, welche zur Expression der *Leishmania infantum* Antigene *thiol-specific antioxidant protein Gen* (TSA) und *kinetoplastid membrane protein 11* (Kmp-11) oder von Allelen oder Derivaten davon mit entsprechender Funktion führen.  
20
20. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 19, wobei die Genprodukte oder Allele oder Derivate davon mit entsprechender Funktion als ein singuläres Fusionsprotein exprimiert werden.
- 25 21. DNA-Expressionskonstrukt nach wenigstens einem der Ansprüche 17 bis 20, wobei das Expressionskonstrukt als kovalent geschlossenes lineares Desoxyribonukleinsäuremolekül vorliegt, welches einen linearen Doppelstrang-

bereich aufweist, wobei die doppelstrangbildenden Einzelstränge durch kurze einzelsträngige Schlaufen aus Desoxyribonukleinsäurenukleotiden verknüpft sind, wobei die doppelstrangbildenden Einzelstränge nur aus der kodierenden Sequenz unter Kontrolle eines im zu impfenden Tier operablen Promoters und einer Terminatorsequenz bestehen.

5

22. DNA-Expressionskonstrukt nach wenigstens einem der Ansprüche 17 bis 20, wobei die kodierenden Polynukleotidsequenzen in einem zirkulär doppelsträngigen Expressionsvektor vorliegen.

10

23. DNA-Expressionskonstrukt nach wenigstens einem der Ansprüche 17 bis 22, wobei das DNA-Expressionskonstrukt zur Steigerung der Transfektionseffizienz mit einem oder mehreren Oligopeptiden kovalent verknüpft ist.

15

24. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 23, wobei das DNA-Expressionskonstrukt mit einem Oligopeptid aus 3 bis 30 Aminosäuren konjugiert ist, wobei das Oligopeptid zur Hälfte aus basischen Aminosäuren aus der Gruppe Arginin und Lysin besteht.

25

25. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 24, wobei das konjugierte Oligopeptid die Aminosäuresequenz YGRKKRRQRRR aufweist.

20

26. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 23, wobei das linear-kovalent geschlossenen DNA-Expressionskonstrukte mit einem die Kernlokalisationssequenz (NLS) des large T-Antigens von SV40 enthaltenden Peptid mit der Aminosäuresequenz PKKKRKV modifiziert ist.

27. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 17 oder 18, wobei die Sequenz für gp63 kodon-optimiert ist.

25

28. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 27, enthaltend die Sequenz Seq.ID 5.

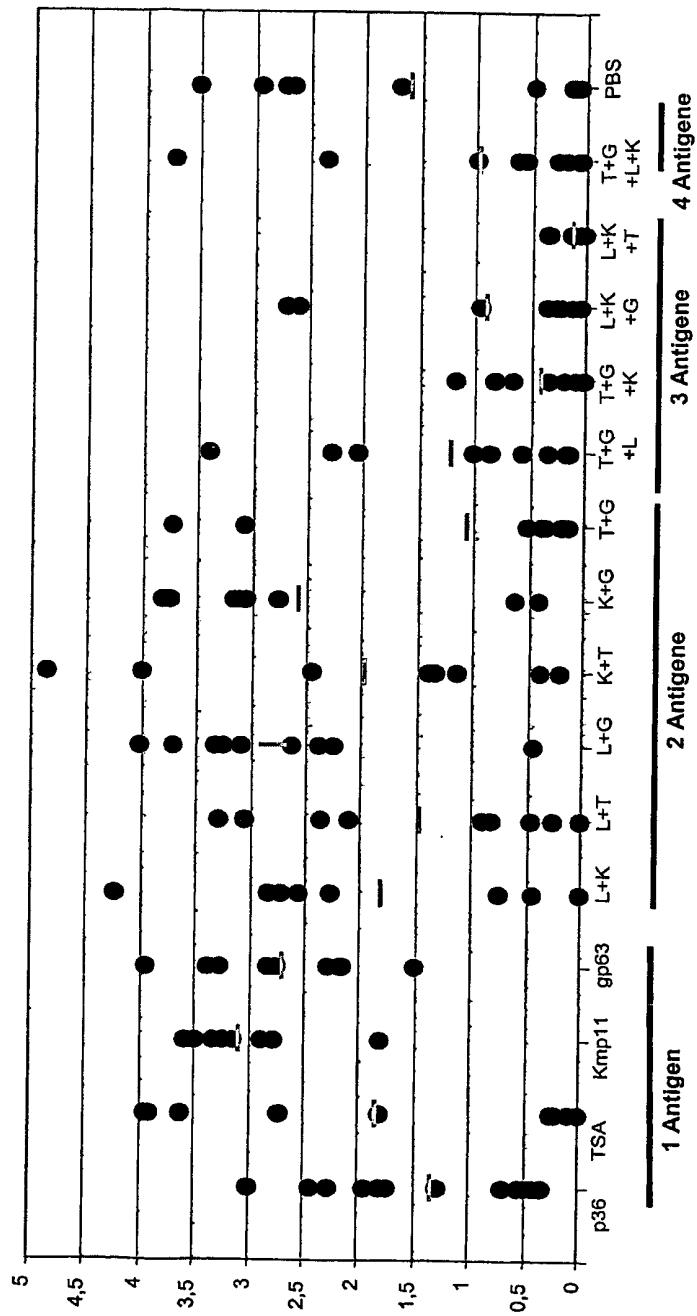
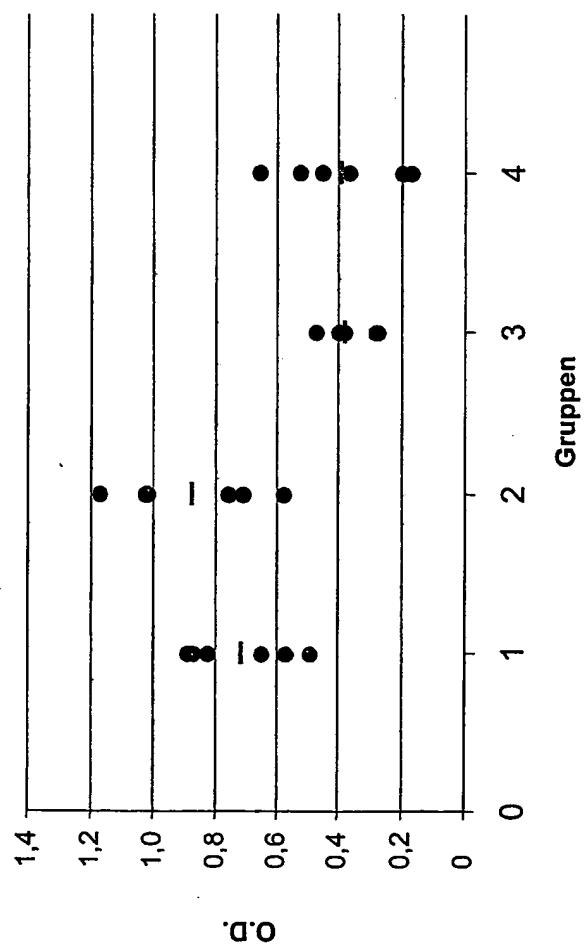
**Fig. 1:**

Fig. 2:



XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt  
 SEQUENCE LISTING

<110> Mologen AG  
 <120> MITTEL ZUR BEHANDLUNG VON INFektIONEN MIT LEISHMANIOSE  
 <130> XI 1827-03  
 <150> EP 03090368.6  
 <151> 2004-10-22  
 <150> EP 03090368.6  
 <151> 2003-10-22  
 <160> 36  
 <170> PatentIn version 3.3  
 <210> 1  
 <211> 279  
 <212> DNA  
 <213> Leishmania infantum  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> DNA Sequenz des Leishmania infantum kinetoplastid membrane  
 protein 11 Gens (kmp-11)  
  
 <400> 1  
 atggccacca cgtacgagga gtttcggcg aagctggacc gcctggatga ggagttcaac 60  
 aggaagatgc aggagcagaa cgccaagttc tttcgccaca agccggatga gtcgacgctg 120  
 tcgccccaga tgaaggagca ctacgagaag ttcgagcgca tgatcaagga acacacagag 180  
 aagttcaaca agaagatgca cgagcactcg gagcacttca agcagaagtt cgccgagctg 240  
 ctcgagcagc agaaggctgc gcagtaccca tccaaagtaa 279  
  
 <210> 2  
 <211> 92  
 <212> PRT  
 <213> Leishmania infantum  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Protein Sequenz des Leishmania infantum kinetoplastid membrane  
 protein 11 (kmp-11)  
  
 <400> 2  
  
 Met Ala Thr Thr Tyr Glu Glu Phe Ser Ala Lys Leu Asp Arg Leu Asp  
 1 5 10 15  
  
 Glu Glu Phe Asn Arg Lys Met Gln Glu Gln Asn Ala Lys Phe Phe Ala  
 20 25 30  
  
 Asp Lys Pro Asp Glu Ser Thr Leu Ser Pro Glu Met Lys Glu His Tyr  
 35 40 45

## XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt

Glu	Lys	Phe	Glu	Arg	Met	Ile	Lys	Glu	His	Thr	Glu	Lys	Phe	Asn	Lys
50															
														60	

Lys	Met	His	Glu	His	Ser	Glu	His	Phe	Lys	Gln	Lys	Phe	Ala	Glu	Leu
65															80

Leu	Glu	Gln	Gln	Lys	Ala	Ala	Gln	Tyr	Pro	Ser	Lys
85											90

<210> 3  
<211> 600  
<212> DNA  
<213> Leishmania infantum

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> DNA Sequenz des Leishmania infantum Antigene thiol-specific antioxidant protein Gens (TSA)

<400> 3	atgtcctgcg gtaacgccaa gatcaactgt cccgcgcgc cttcgagga ggtggcgatc	60
atgcccacg gcagcttcaa gaagatcagc ctgcgcgcct acaaggcga gtgggtcgat	120	
ctcttcttc acccgctcga ctccacccatc gtgtgcccgaa cagagatcat cgccgttctcc	180	
gaaaacgtga gtcgcttcaa cgagctcaac tgcgaggatcc tcgcgtgatc catggacagc	240	
gagtacgcgc acctgcgttg gacgctgcag gaccgcaaga agggcggcct cggcgccatg	300	
gcgattccaa tgctggccga caagaccaag agtacgtatc gtgcctacgg cgtgctggag	360	
gagaaacagg gcgtggccta ccgcggctta ttcatcatcg accccaatgg catggtgccgc	420	
cagatcacccg tcaacgacat gccgggtggc cgcaacgtgg aggaggtct gcgcctgatc	480	
gaggcttttc agttcgatggaa gaagcacggc gaggtgtgcc ccgcgaactg gaagaaggc	540	
ccccccacgaa tgaagccggaa gccgaaggcg tctgtcgaag gatacttcag caagcagtaa	600	

<210> 4  
<211> 199  
<212> PRT  
<213> Leishmania infantum

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Protein DNA Sequenz des Leishmania infantum thiol-specific antioxidant Proteins (TSA)

<400> 4

Met	Ser	Cys	Gly	Asn	Ala	Lys	Ile	Asn	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Phe	Glu
1															15
5															
10															

XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt  
 Glu Val Ala Leu Met Pro Asn Gly Ser Phe Lys Lys Ile Ser Leu Ala  
 20 25 30

Ala Tyr Lys Gly Lys Trp Val Val Leu Phe Phe Tyr Pro Leu Asp Phe  
 35 40 45

Thr Phe Val Cys Pro Thr Glu Ile Ile Ala Phe Ser Glu Asn Val Ser  
 50 55 60

Arg Phe Asn Glu Leu Asn Cys Glu Val Leu Ala Cys Ser Met Asp Ser  
 65 70 75 80

Glu Tyr Ala His Leu Gln Trp Thr Leu Gln Asp Arg Lys Lys Gly Gly  
 85 90 95

Leu Gly Ala Met Ala Ile Pro Met Leu Ala Asp Lys Thr Lys Ser Ile  
 100 105 110

Ala Arg Ala Tyr Gly Val Leu Glu Glu Lys Gln Gly Val Ala Tyr Arg  
 115 120 125

Gly Leu Phe Ile Ile Asp Pro Asn Gly Met Val Arg Gln Ile Thr Val  
 130 135 140

Asn Asp Met Pro Val Gly Arg Asn Val Glu Glu Val Leu Arg Leu Leu  
 145 150 155 160

Glu Ala Phe Gln Phe Val Glu Lys His Gly Glu Val Cys Pro Ala Asn  
 165 170 175

Trp Lys Lys Gly Ala Pro Thr Met Lys Pro Glu Pro Lys Ala Ser Val  
 180 185 190

Glu Gly Tyr Phe Ser Lys Gln  
 195

<210> 5  
 <211> 1800  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> DNA Sequenz des codon-optimierten Leishmania infantum Antigen  
 gp63

<400> 5  
 atgtctgtgg actccttcctc cacccacaga cacagatctg tggctgccag actgggtgaga 60  
 ctggctgcag ctggagctgc tgtgattgct gctgtggca cagctgctgc ctggggccat 120  
 gctggagctg tgcagcacag atgcatccat gatgccatgc aggccagagt gagacagtct 180

XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt  
 gtggccagac accacacacgc cccaggagct gtgtctgctg tggccgtcc ctatgtgacc 240  
 ctggacacag ctgcagctgc agacagaaga ccaggctctg cccccacagt ggtgagagct 300  
 gccaactggg gagcccttag gattgctgtg tccacagagg acctgacaga cccagcctac 360  
 cactgtgccca gagtgggcca gcacatcaag agaagactgg gaggagtgg catctgcaca 420  
 gctgaggaca tcctgacaga tgagaagaga gacatcctgg tgaagcacct gatccccag 480  
 gccctgcagc tgcacacaga gagactgaaa gtgagacagg tgcaggacaa gtggaaggtg 540  
 acaggcatgg gagatgtatgt gtgtctgac ttcaagggtgc ccccagccca catcacagat 600  
 ggccctgtcca acacagactt tgtatgttat gtgacctctg tgccctctga ggagggagtg 660  
 ctggcctggg ccaccatctg ccaggtgttc tctgtatggcc acccaaccgt gggagtgtac 720  
 aacatcccag ctgccaacat tgccctccaga tatgaccagc tggtgaccag agtggtgacc 780  
 catgagatgg cccatgcctt gggcttctct gtgggcttct ttgagggagc cagaatcctg 840  
 gagtccatct ccaatgttag acacaaggac tttgatgtgc cagtgatcaa ctccctccact 900  
 gctgtggcca aggccagaga gcagtatggc tgtgacaccc tggagtacct ggagatttag 960  
 gaccagggag gagctggctc tgctggctcc cacatcaaga tgagaaatgc ccaggatgag 1020  
 ctgatggccc cagctgcagc tgcaggctac tactctgccc tgaccacggc catcttccag 1080  
 gacctgggtct tctaccaggc tgacttctcc aaggctgagg ttagtgcctg gggcagaaat 1140  
 gctggctgtg ctttcctgtc tgagaagtgc atggagagaa acatcaccga gtggccagcc 1200  
 atgttctgca atgagaatga ggtgaccatg agatgccccca cttccagact gtccctggc 1260  
 aagtgtggag tgaccagaca cccagacctg ccccccactt ggcagtactt cacagacccc 1320  
 tccctggctg gcatctctgc cttcatggac tgctgcccag tggcgagcc ctatggagat 1380  
 ggctcctgtg cccagagagc ctctgaggct ggagccccct tcaagggttt caatgtgttc 1440  
 tctgtgtctg cccgatgcat tgatggagcc ttcagaccca agacctccca tggcatcatc 1500  
 aagtccatgt ctggcctgtg tgccaatgtg agatgtgaca cagccaccag aacctactct 1560  
 gtgcaggtgc atggaggctc tggctatgcc aactgcaccc caggcctgag agtggagctg 1620  
 tccacagtgt cctctgcctt tgaggaggga ggctacatca cctgcccccc ctatgtggag 1680  
 gtgtgccagg gcaatgtgca ggctgccaag gatggaggca atgcagctgc tggcagaaga 1740  
 gccccagag ctgctgccac agccctgctg gtggctgccc tgctggctgt gggccctgttag 1800

<210> 6  
 <211> 599  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Protein Sequenz des codon-optimierten Leishmania infantum Antigen gp63

<400> 6 XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt

Met Ser Val Asp Ser Ser Ser Thr His Arg His Arg Ser Val Ala Ala  
1 5 10 15

Arg Leu Val Arg Leu Ala Ala Ala Gly Ala Ala Val Ile Ala Ala Val  
20 25 30

Gly Thr Ala Ala Ala Trp Ala His Ala Gly Ala Val Gln His Arg Cys  
35 40 45

Ile His Asp Ala Met Gln Ala Arg Val Arg Gln Ser Val Ala Arg His  
50 55 60

His Thr Ala Pro Gly Ala Val Ser Ala Val Gly Leu Pro Tyr Val Thr  
65 70 75 80

Leu Asp Thr Ala Ala Ala Asp Arg Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr  
85 90 95

Val Val Arg Ala Ala Asn Trp Gly Ala Leu Arg Ile Ala Val Ser Thr  
100 105 110

Glu Asp Leu Thr Asp Pro Ala Tyr His Cys Ala Arg Val Gly Gln His  
115 120 125

Ile Lys Arg Arg Leu Gly Val Asp Ile Cys Thr Ala Glu Asp Ile  
130 135 140

Leu Thr Asp Glu Lys Arg Asp Ile Leu Val Lys His Leu Ile Pro Gln  
145 150 155 160

Ala Leu Gln Leu His Thr Glu Arg Leu Lys Val Arg Gln Val Gln Asp  
165 170 175

Lys Trp Lys Val Thr Gly Met Gly Asp Asp Val Cys Ser Asp Phe Lys  
180 185 190

Val Pro Pro Ala His Ile Thr Asp Gly Leu Ser Asn Thr Asp Phe Val  
195 200 205

Met Tyr Val Thr Ser Val Pro Ser Glu Glu Gly Val Leu Ala Trp Ala  
210 215 220

Thr Ile Cys Gln Val Phe Ser Asp Gly His Pro Thr Val Gly Val Ile  
225 230 235 240

Asn Ile Pro Ala Ala Asn Ile Ala Ser Arg Tyr Asp Gln Leu Val Thr  
245 250 255

XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt

Arg Val Val Thr His Glu Met Ala His Ala Leu Gly Phe Ser Val Gly  
260 265 270

Phe Phe Glu Gly Ala Arg Ile Leu Glu Ser Ile Ser Asn Val Arg His  
275 280 285

Lys Asp Phe Asp Val Pro Val Ile Asn Ser Ser Thr Ala Val Ala Lys  
290 295 300

Ala Arg Glu Gln Tyr Gly Cys Asp Thr Leu Glu Tyr Leu Glu Ile Glu  
305 310 315 320

Asp Gln Gly Gly Ala Gly Ser Ala Gly Ser His Ile Lys Met Arg Asn,  
325 330 335

Ala Gln Asp Glu Leu Met Ala Pro Ala Ala Ala Gly Tyr Tyr Ser  
340 345 350

Ala Leu Thr Thr Ala Ile Phe Gln Asp Leu Gly Phe Tyr Gln Ala Asp  
355 360 365

Phe Ser Lys Ala Glu Val Met Pro Trp Gly Arg Asn Ala Gly Cys Ala  
370 375 380

Phe Leu Ser Glu Lys Cys Met Glu Arg Asn Ile Thr Glu Trp Pro Ala  
385 390 395 400

Met Phe Cys Asn Glu Asn Glu Val Thr Met Arg Cys Pro Thr Ser Arg  
405 410 415

Leu Ser Leu Gly Lys Cys Gly Val Thr Arg His Pro Asp Leu Pro Pro  
420 425 430

Tyr Trp Gln Tyr Phe Thr Asp Pro Ser Leu Ala Gly Ile Ser Ala Phe  
435 440 445

Met Asp Cys Cys Pro Val Ala Glu Pro Tyr Gly Asp Gly Ser Cys Ala  
450 455 460

Gln Arg Ala Ser Glu Ala Gly Ala Pro Phe Lys Gly Phe Asn Val Phe  
465 470 475 480

Ser Asp Ala Ala Arg Cys Ile Asp Gly Ala Phe Arg Pro Lys Thr Ser  
485 490 495

His Gly Ile Ile Lys Ser Tyr Ala Gly Leu Cys Ala Asn Val Arg Cys  
500 505 510

## XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt

Asp Thr Ala Thr Arg Thr Tyr Ser Val Gln Val His Gly Gly Ser Gly  
 515 520 525

Tyr Ala Asn Cys Thr Pro Gly Leu Arg Val Glu Leu Ser Thr Val Ser  
 530 535 540

Ser Ala Phe Glu Glu Gly Gly Tyr Ile Thr Cys Pro Pro Tyr Val Glu  
 545 550 555 560

Val Cys Gln Gly Asn Val Gln Ala Ala Lys Asp Gly Gly Asn Ala Ala  
 565 570 575

Ala Gly Arg Arg Gly Pro Arg Ala Ala Ala Thr Ala Leu Leu Val Ala  
 580 585 590

Ala Leu Leu Ala Val Ala Leu  
 595

<210> 7  
 <211> 939  
 <212> DNA  
 <213> Leishmania infantum

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> DNA Sequenz Leishmania Antigen p36 (LACK).  
  
 <400> 7  
 atgaactacg agggtcaccc gaagggccac cgcggatggg tcacccctt ggcctgcccg 60  
 cagcaggccg ggtcgtacat caaggtggtg tcgacgtcgc gcgtatggcac ggccatctcg 120  
 tggaaagcca accccgaccg ccacagcgtg gacagcgact acggcttgcc gagccaccgc 180  
 ctgcaggggcc acacccggctt cgtgtcgtgt gtgtcgctgg cccacgcccac cgactacgcg 240  
 ctgaccgcgt cttgggaccg ctccatccgc atgtgggacc tgcgcaatgg ccagtgcctag 300  
 cgcaagttcc tgaagcacac caaggacgtg ctgcgcgtcg cttctcgcc ggacgaccgc 360  
 ctgatcgtgt ccgcggcccg cgacaacgtg atccgcgtgt ggaacgtggc gggcgagtgc 420  
 atgcacgagt ttctgcgcga cggccacgag gactgggtga gcagcatctg tttctcgcccg 480  
 tcgctggagc atccgatcgt ggtgtccggc agctgggaca acaccatcaa ggtatggAAC 540  
 gtgaacgggg gcaagtgtga ggcacgcgc aaggccaca gcaactacgt gtccacggcg 600  
 acgggtgcgc cagacgggtc gctgtgcgcg tccggcggca aggacggcgc ggcgtgt 660  
 tgggacctga gcacccggcga gcagctgttc aagatcaacg tggagtcgcc catcaaccag 720  
 atcgcccttc cgcccaaccg cttctggatg tgcgtgcga cggagaggc cctgtccgtg 780  
 tacgacactgg agagcaaggc tgtgattgcg gagctgacgc cggacggcgc gaagccgtcc 840

## XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt

gagtgcatct ccattgcctg gtccggcggac ggcaaacactc tgtactccgg tcacaaggac	900
aacctgatcc gcgtgtggtc catctccgac gccgagtaa	939

<210> 8  
<211> 312  
<212> PRT  
<213> Leishmania infantum

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Protein Sequenz Leishmania Antigen p36 (LACK)

<400> 8

Met Asn Tyr Glu Gly His Leu Lys Gly His Arg Gly Trp Val Thr Ser			
1	5	10	15

Leu Ala Cys Pro Gln Gln Ala Gly Ser Tyr Ile Lys Val Val Ser Thr		
20	25	30

Ser Arg Asp Gly Thr Ala Ile Ser Trp Lys Ala Asn Pro Asp Arg His		
35	40	45

Ser Val Asp Ser Asp Tyr Gly Leu Pro Ser His Arg Leu Glu Gly His		
50	55	60

Thr Gly Phe Val Ser Cys Val Ser Leu Ala His Ala Thr Asp Tyr Ala			
65	70	75	80

Leu Thr Ala Ser Trp Asp Arg Ser Ile Arg Met Trp Asp Leu Arg Asn		
85	90	95

Gly Gln Cys Gln Arg Lys Phe Leu Lys His Thr Lys Asp Val Leu Ala		
100	105	110

Val Ala Phe Ser Pro Asp Asp Arg Leu Ile Val Ser Ala Gly Arg Asp		
115	120	125

Asn Val Ile Arg Val Trp Asn Val Ala Gly Glu Cys Met His Glu Phe		
130	135	140

Leu Arg Asp Gly His Glu Asp Trp Val Ser Ser Ile Cys Phe Ser Pro			
145	150	155	160

Ser Leu Glu His Pro Ile Val Val Ser Gly Ser Trp Asp Asn Thr Ile		
165	170	175

Lys Val Trp Asn Val Asn Gly Gly Lys Cys Glu Arg Thr Leu Lys Gly		
180	185	190

XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt

His Ser Asn Tyr Val Ser Thr Val Thr Val Ser Pro Asp Gly Ser Leu  
195 200 205

Cys Ala Ser Gly Gly Lys Asp Gly Ala Ala Leu Leu Trp Asp Leu Ser  
210 215 220

Thr Gly Glu Gln Leu Phe Lys Ile Asn Val Glu Ser Pro Ile Asn Gln  
225 230 235 240

Ile Ala Phe Ser Pro Asn Arg Phe Trp Met Cys Val Ala Thr Glu Arg  
245 250 255

Ser Leu Ser Val Tyr Asp Leu Glu Ser Lys Ala Val Ile Ala Glu Leu  
260 265 270

Thr Pro Asp Gly Ala Lys Pro Ser Glu Cys Ile Ser Ile Ala Trp Ser  
275 280 285

Ala Asp Gly Asn Thr Leu Tyr Ser Gly His Lys Asp Asn Leu Ile Arg  
290 295 300

Val Trp Ser Ile Ser Asp Ala Glu  
305 310

<210> 9  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Simian virus 40

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Kernlokalisationssequenz  
  
<400> 9

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val  
1 5

<210> 10  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Langes T-Peptidfragment des HIV-1 Genprodukts TAT  
  
<400> 10

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
1 5 10

## XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt

<210> 11  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> 1. PCR-Primer links; synthetisches Oligo

<400> 11  
ttatatggta ccatgaacat acgagggtca cct 33

<210> 12  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> 1. PCR-Primer rechts; synthetisches Oligo

<400> 12  
ttatatgagc tcagaagaca cggacagggga cctcttccgt cg 42

<210> 13  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> 2. PCR-Primer links; synthetisches Oligo

<400> 13  
ttatatggta ccatgaacat acgagggtca cct 33

<210> 14  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> 2. PCR-Primer rechts; synthetisches Oligo

<400> 14  
ttatatgagc tcttactcggtccgtcgaga tgg 33

<210> 15  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Kmp-11 PCR-Primer links; synthetisches Oligo

<400> 15  
attataggta ccatggccac cacgtacgag 30

<210> 16  
<211> 32

XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Kmp-11 PCR-Primer rechts; synthetisches Oligo

<400> 16  
 ttaattctcg agttacttgg atgggtactg cg

32

<210> 17  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> TSA PCR-Primer links; synthetisches Oligo

<400> 17  
 aattatggta ccatgtcctg cggtaacgcc aagatc

36

<210> 18  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> TSA PCR-Primer rechts; synthetisches Oligo

<400> 18  
 aataatactcg agttactgtct tgctgaagta tccttcgac

39

<210> 19  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> TSA linker Mutationsprimer; synthetisches Oligo

<400> 19  
 taccgcggtc tcttcatcat cg

22

<210> 20  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> TSA rechter Mutationsprimer; synthetisches Oligo

<400> 20  
 attgggggtc tcgatgaata gaccgcggta gg

32

<210> 21  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>

XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt  
<223> gp63 Fragment 1 linker Primer; synthetisches Oligo

<400> 21  
attattggta ccatgtctgt ggact

25

<210> 22  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> gp63 Fragment 1 rechter Primer; synthetisches Oligo

<400> 22  
ttatatggtc tctctcaggg ctccccagtt g

31

<210> 23  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> gp63 Fragment 2 linker Primer; synthetisches Oligo

<400> 23  
attataggtc tcctgagaat tgctgtgtcc acagag

36

<210> 24  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> gp63 Fragment 2 rechter Primer; synthetisches Oligo

<400> 24  
ttatatggtc tcacagaggc cacatacacac acaa

34

<210> 25  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> gp63 Fragment 3 linker Primer; synthetisches Oligo

<400> 25  
tattatggtc tcctctgtgc cctctgagga gggagtgtcg gcc

43

<210> 26  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> gp63 Fragment 3 rechter Primer; synthetisches Oligo

<400> 26  
aattatggtc tcctcaatct ccaggtactc cagg

34

## XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt

<210> 27  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> gp63 Fragment 4 linker Primer; synthetisches Oligo

<400> 27  
attataggtc tcattgagga ccagggagga g 31

<210> 28  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> gp63 Fragment 4 rechter Primer; synthetisches Oligo

<400> 28  
taatatggtc tcgtgtctgg tcactccaca ctgg 34

<210> 29  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> gp63 Fragment 5 linker Primer; synthetisches Oligo

<400> 29  
attataggtc tcagacaccc agacacctgcc c 31

<210> 30  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> gp63 Fragment 5 rechter Primer; synthetisches Oligo

<400> 30  
ttatatggtc tcggggtgca gttggcatacg cc 32

<210> 31  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> gp63 Fragement 6 linker Primer; synthetisches Oligo

<400> 31  
atatatggtc tccaccccaag gcctgagagt gg 32

<210> 32  
<211> 34

XI 1827-03 - Mologen - PCT - LeishCocktail .ST25.txt

<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> gp63 Fragment 6 rechter Primer; synthetisches Oligo

<400> 32  
taatatgagc tcctacaggg ccacagccag cagg 34

<210> 33  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> gp63 Gesamtsequenz linker Primer; synthetisches Oligo

<400> 33  
attattggta ccatgtctgt ggact 25

<210> 34  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> gp63 Gesamtsequenz rechter Primer; synthetisches Oligo

<400> 34  
taatatgagc tcctacaggg ccacagccag cagg 34

<210> 35  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> ODN1; synthetisches Oligo

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (12)..(12)  
<223> T = chemisch modifiziertes Thymin

<400> 35  
gggagtccag ttttctggac 20

<210> 36  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> ODN 2; synthetisches Oligo

<400> 36  
aggggtccag ttttctggac 20

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International Application No.  
PCT/DE2004/002383

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 A61K39/008			
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC			
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K			
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched			
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search			
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
X	WO 03/031469 A (MOLOGEN FORSCHUNGS-, ENTWICKLUNGS- UND VERTRIEBS GMBH; LOPEZ, SONIA, M) 17 April 2003 (2003-04-17) claims; examples	1,6-17, 19,21-26	
Y	LOPEZ-FUERTES L ET AL: "DNA vaccination with linear minimalist (MIDGE) vectors confers protection against Leishmania major infection in mice" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 21, no. 3-4, 13 December 2002 (2002-12-13), pages 247-257, XP004394510 ISSN: 0264-410X	1-28	
X	Zusammenfassung; Ergebnisse; Diskussion; -/-	1,6-10, 12-17, 19, 21-24,26	
Y		1-28	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.	
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed			
*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the International search report		
15 February 2005	09/03/2005		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Sommer, B		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE2004/002383

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/098359 A (CORIXA CORPORATION; REED, STEVEN, G; CAMPOS-NETO, ANTONIO; WEBB, JOHN,) 12 December 2002 (2002-12-12) claims; examples 19-23	1,3,6,8, 13,14, 17-20,22 1-28
X	SKEIKY Y A W ET AL: "Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 20, no. 27-28, 10 September 2002 (2002-09-10), pages 3292-3303, XP004378524 ISSN: 0264-410X	1,3,6,8, 13,14, 17-20,22
Y	Zusammenfassung; Diskussion;	1-28
X	MENDEZ S ET AL: "Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 20, no. 31-32, 1 November 2002 (2002-11-01), pages 3702-3708, XP004388612 ISSN: 0264-410X	1,2,6,8, 13,14, 17,19,22
Y	Zusammenfassung; Diskussion;	1-28
X	RAMREZ J R ET AL: "Attenuated Toxoplasma gondii ts-4 mutants engineered to express the Leishmania antigen KMP-11 elicit a specific immune response in BALB/c mice" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 20, no. 3-4, 12 November 2001 (2001-11-12), pages 455-461, XP004310152 ISSN: 0264-410X	1,8,13, 14,17, 19,22
Y	abstract	1-28
X	COTE-SIERRA JAVIER ET AL: "Bacterial lipoprotein-based vaccines induce tumor necrosis factor-dependent type 1 protective immunity against Leishmania major" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 70, no. 1, January 2002 (2002-01), pages 240-248, XP002317814 ISSN: 0019-9567	1,8,13, 14,17, 19,22
Y	abstract	1-28

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No  
PCT/DE2004/002383

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 03031469	A 17-04-2003	WO 03031469 A2	EP 1432439 A2	17-04-2003
		US 2004235771 A1		30-06-2004
				25-11-2004
WO 02098359	A 12-12-2002	US 2002081320 A1	US 2002169285 A1	27-06-2002
		WO 02098359 A2		14-11-2002
				12-12-2002

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE2004/002383

**A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 7 A61K39/008

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search

**C. ALS WESENTLICH ANGEGEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der In Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 03/031469 A (MOLOGEN FORSCHUNGS-, ENTWICKLUNGS- UND VERTRIEBS GMBH; LOPEZ, SONIA, M) 17. April 2003 (2003-04-17) Ansprüche; Beispiele	1, 6-17, 19, 21-26
Y	LOPEZ-FUERTES L ET AL: "DNA vaccination with linear minimalistic (MIDGE) vectors confers protection against Leishmania major infection in mice" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, Bd. 21, Nr. 3-4, 13. Dezember 2002 (2002-12-13), Seiten 247-257, XP004394510 ISSN: 0264-410X Zusammenfassung; Ergebnisse; Diskussion;	1-28
X		1, 6-10, 12-17, 19, 21-24, 26
Y		1-28
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :  
 \*'A' Veröffentlichung, die den eigentlichen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmelde datum veröffentlicht worden ist
- \*'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmelde datum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalem Anmelde datum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*'g' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

15. Februar 2005

09/03/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3015

Bevollmächtigter Bediensteter

Sommer, B

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE2004/002383
---

**C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 02/098359 A (CORIXA CORPORATION; REED, STEVEN, G; CAMPOS-NETO, ANTONIO; WEBB, JOHN,) 12. Dezember 2002 (2002-12-12) Ansprüche; Beispiele 19-23	1,3,6,8, 13,14, 17-20,22 1-28
X	SKEIKY Y A W ET AL: "Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, Bd. 20, Nr. 27-28, 10. September 2002 (2002-09-10), Seiten 3292-3303, XP004378524 ISSN: 0264-410X	1,3,6,8, 13,14, 17-20,22
Y	Zusammenfassung; Diskussion;	1-28
X	MENDEZ S ET AL: "Optimization of DNA vaccination against cutaneous leishmaniasis" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, Bd. 20, Nr. 31-32, 1. November 2002 (2002-11-01), Seiten 3702-3708, XP004388612 ISSN: 0264-410X	1,2,6,8, 13,14, 17,19,22
Y	Zusammenfassung; Diskussion;	1-28
X	RAMREZ J R ET AL: "Attenuated Toxoplasma gondii ts-4 mutants engineered to express the Leishmania antigen KMP-11 elicit a specific immune response in BALB/c mice" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, Bd. 20, Nr. 3-4, 12. November 2001 (2001-11-12), Seiten 455-461, XP004310152 ISSN: 0264-410X	1,8,13, 14,17, 19,22
Y	Zusammenfassung	1-28
X	COTE-SIERRA JAVIER ET AL: "Bacterial lipoprotein-based vaccines induce tumor necrosis factor-dependent type 1 protective immunity against Leishmania major" INFECTION AND IMMUNITY, Bd. 70, Nr. 1, Januar 2002 (2002-01), Seiten 240-248, XP002317814 ISSN: 0019-9567	1,8,13, 14,17, 19,22
Y	Zusammenfassung	1-28

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen  
**PCT/DE2004/002383**

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 03031469	A	17-04-2003	WO EP US	03031469 A2 1432439 A2 2004235771 A1		17-04-2003 30-06-2004 25-11-2004
WO 02098359	A	12-12-2002	US	2002081320 A1 2002169285 A1 02098359 A2		27-06-2002 14-11-2002 12-12-2002

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**